

AUS DER ABTEILUNG  
FÜR NEUROCHIRURGIE

*Prof. Dr. A. Brawanski*

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# **Der Einfluss von CD95/Fas auf Motorik, Lernfähigkeit, Regeneration und Apoptose nach Schädelhirntrauma**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Martina Berger*

2009

**Dekan:**

**Prof. Dr. Bernhard Weber**

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. C. Woertgen

2. Berichterstatter:

PD Dr. F. Schlachetzki

Tag der mündlichen Prüfung:

04.02.2010

## Inhaltsverzeichnis

Artikel.....	Seite 4
Einleitung.....	Seite 7
Material und Methoden.....	Seite 8
Kontrolliertes kortikales Trauma (KKT)	
Verhaltenstests	
Beam Balance Test	
Beam Walking Test	
Morris Water Maze	
Histologie	
Histologische Aufarbeitung	
Nissl - Färbung	
TUNEL - Färbung	
Histologische Auswertung	
Ergebnisse.....	Seite 13
Etablierung des KKT für Mäuse	
Allgemeinzustand der Tiere	
Läsionsgröße	
Schädigung von Motorik sowie Lernfähigkeit nach KKT	
Neuronale Apoptose nach KKT	
Untersuchung der Bedeutung von CD95/Fas für die Regeneration nach KKT	
Neuronale Apoptose in Ipr- und Kontrolltieren	
Neurologische Regeneration nach KKT	
Ipr- Mäuse haben geringere neurologische Defizite 48 h und 72 h nach KKT	
Geringere Regeneration von Lernen und Gedächtnis	
Diskussion.....	Seite 21
Literatur.....	Seite 23
Lebenslauf.....	Seite 24
Danksagung.....	Seite 25

# CD95/Fas mediates cognitive improvement after traumatic brain injury

Christoph P Beier<sup>1,2,\*</sup>, Martina Kölbl<sup>2,\*</sup>, Dagmar Beier<sup>1</sup>, Chris Woertgen<sup>2</sup>, Ulrich Bogdahn<sup>1</sup>, Alexander Brawanski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, University of Regensburg, Medical School, Universitätsstrasse 84, 93053 Regensburg, Germany; <sup>2</sup>Department of Neurosurgery, University of Regensburg, Medical School, Franz-Josef-Strauss Allee 11, 93042 Regensburg, Germany

Cell Research advance online publication 24 July 2007; doi: 10.1038/cr.2007.60

CD95 (APO-1/Fas)/CD95L (APO-1L/FasL/CD178) is a receptor/cytokine pair of the tumor necrosis factor/nerve growth factor (TNF/NGF) superfamily. Similar to other receptors of this family, activation of CD95/Fas results in the formation of a death-inducing signaling complex (DISC) and subsequent activation of the apoptotic cascade [1]. There is increasing evidence that CD95/Fas also signals survival, proliferation, and migration in CD95/Fas-expressing cells that are resistant to CD95L/FasL-induced cell death [2, 3]. This non-apoptotic signaling of CD95/Fas is also referred to as “reverse signaling” [3]. In contrast to the apoptotic signaling cascade, the molecular mechanisms resulting in the activation of non-apoptotic pathways are still vague [3].

The physiological role of CD95/Fas expression in the central nervous system is unknown. Both, CD95/Fas and CD95L/FasL have been detected in the brain [4-6], but their spatial and temporal expression patterns change during development [5, 7]. Mice with defective CD95/Fas receptor (lpr-mice) or ligand (gld-mice) are protected in various animal models of acute neuronal damage, e.g. after ischemic stroke or spinal trauma [8, 9]. Zuliani and coworkers provided first evidence that CD95/Fas-mediated “reverse signaling” might mediate neuroregeneration in the CNS [10]. They could show that CD95/Fas did not induce apoptosis in cortical and hippocampal neurons but rather controlled branching of these neurons *in vitro*. In

addition, the authors found a significant difference in the number of dendritic branches in mice deficient in CD95/Fas and CD95L/FasL, suggesting an involvement of this mechanism during embryonic development. It is unknown whether CD95/Fas-controlled neuronal branching might be relevant in neurological diseases [10]. Because neuronal branching significantly contributes to neuroplasticity and therefore neurological recovery after acute neuronal damage, we speculated that CD95/Fas might be involved in the regeneration after traumatic brain injury (TBI). To test this hypothesis, we investigated the acute and chronic responses of CD95/Fas-deficient lpr-mice and wildtype control animals after controlled cortical impact (CCI).

CCI is a well-established animal model for TBI. It was performed using MRL-lpr mice and wildtype control animals with the same genetic background (composite genomic background: LG (75%), AKR/J (12.6%), C3H (12.1%), C57BL/6 (0.3%), Harlan UK Limited, Great Britain) as described previously (CCI: 2 mm flat-tip impounder; pressure: 25 kPa; depth: 1 mm, impact duration: 100 ms) [11]. Because MRL-lpr-mice develop systemic vasculitis at the age of 12 weeks [12], we used 6-8-week-old animals for the experiments. No signs of vasculitis were seen on hematoxylin/eosin-stained slides. To rule out a subconscious investigator bias, CCI, histological evaluation, and behavioral tests were performed “blinded”.

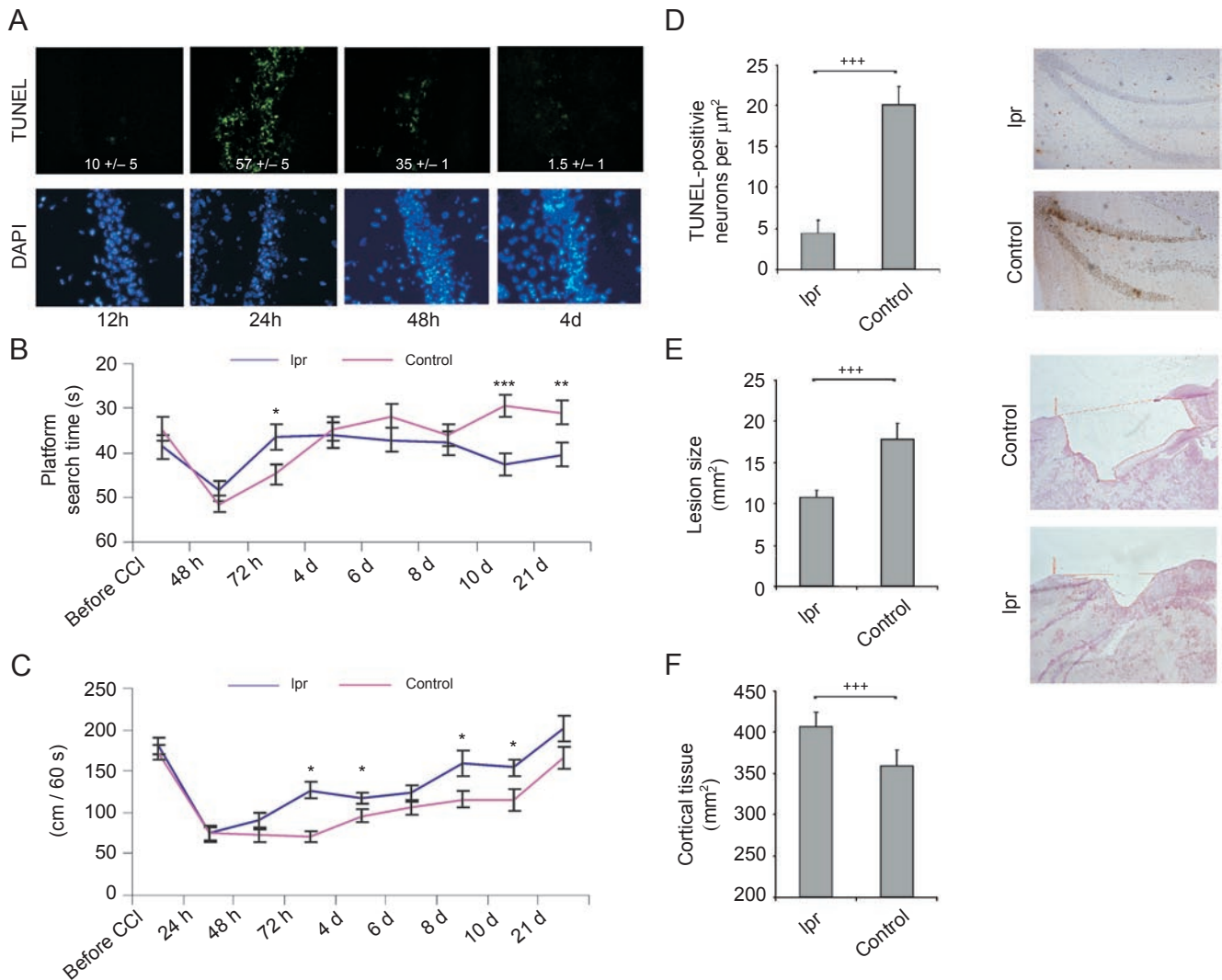
The CCI lesion was placed over the motor cortex causing direct damage of motor cortex and indirect, time-dependent cell death of hippocampal neurons (Figure 1A). We used the beam walking test [13] to determine locomotor deficits and the Morris water maze test [14] to monitor the hippocampal function. In line with previous results, lpr-mice performed significantly better in both tests during the first 72 h after

\*These two authors contributed equally to this work.

Correspondence: Christoph P Beier

Tel: +49-941-941-3258; Fax: +49-941-941-3205

E-mail: Christoph.Beier@gmx.de



**Figure 1** CD95/Fas mediates cognitive improvement after CCI. **(A)** Time course of indirectly damaged hippocampal neurons after CCI. Apoptotic neurons in the dentate gyrus of the hippocampus in wildtype animals were detected using the Apo-direct Kit (Chemicon, München, Germany) for TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) staining. The average number of apoptotic neurons in the dentate gyrus per slide at the time points indicated is given ( $n = 4$  animals). **(B)** Morris water maze test: Mice (lpr  $n = 8$ , control  $n = 8$ ) learned to find the position of an invisible platform in a black water tank (diameter: 1.05 m with white signs for orientation) on 3 consecutive days before CCI. After CCI, the mice had to find the platform within 60 s, where they were allowed to sit for 10 s (5 cycles per timepoint). The platform position remained unchanged during the entire experiment; the mouse was placed randomly in the tank. If the mouse did not find the platform within 60 s, it was placed on the platform for 10 s to enable it to memorize its position. The average latency until the mice found the platform is shown. In all, 6 trials per time point and animal were performed. We did not conduct the Morris water maze test 24 h after CCI to avoid wound infections. **(C)** Beam walking test: The mouse was placed on an aluminum beam (diameter: 0.6 cm, length: 60 cm), from which it had to reach a large platform. The distance that the mouse covered within 60 s was determined. The test was repeated 4 times per time point. If a mouse fell down the beam or did not arrive within 60 s at the arrival platform, the distance until it fell down was measured. The mice learned to walk on the beam 6 times on 3 consecutive days before CCI. **(D)** At 24 h after CCI, lpr-mice had significantly fewer TUNEL-positive neurons in the dentate gyrus of the hippocampus compared with control animals. The number of TUNEL-positive neurons per  $\mu\text{m}^2$  is given. A total of 8 sections per animal (lpr  $n = 5$ , control  $n = 4$ ) were analyzed. Representative pictures are shown. **(E, F)** The lesion volume and the size of the remaining brain tissue were determined after completion of the neurological testing 22 days after CCI (lpr  $n = 8$ , control  $n = 8$ ). The average sizes of the lesion **(E)** and the remaining cortical tissue **(F)** are shown. In all, 5 sections per animal were assessed, representative lesions are shown (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA; +++ $p < 0.001$ , Student's t-test; mean and SEM are given).

the trauma (Figure 1B and 1C). The reduced neurological deficits were paralleled by a significantly reduced number of TUNEL-positive hippocampal neurons in *lpr*- as compared with wildtype mice 24 h after CCI (Figure 1D).

We further tested the mice until 21 days after the trauma. As compared with *lpr*-mice, wildtype mice had enduring and more pronounced locomotor deficits (Figure 1C) due to the direct damage of the motor cortex and subsequent larger lesions (Figure 1E) with less remaining brain tissue (Figure 1F). Notably, wildtype mice that had performed worse in the Morris water maze test directly after CCI improved their spatial memory function faster and better as compared with *lpr*-mice (Figure 1B).

The Morris water maze test determines the spatial memory function and the performance correlates with the integrity of hippocampal neurons that strongly express CD95/Fas [5, 14]. The impaired improvement of the spatial memory function of *lpr*-mice after CCI therefore implies a functional relevance of the “death receptor” CD95/Fas expression on hippocampal neurons. Because neuronal branching is a major mediator for regeneration and subsequent functional recovery, it appears likely that CD95/Fas-mediated neuronal branching is involved in the cognitive improvement after CCI [10]. Our results therefore complement the *in vitro* data published by Zuliani *et al.* and suggest a functional relevance of CD95/Fas-mediated neuronal branching in this paradigmatic animal model.

CD95/Fas has a two-facet role in the pathogenesis of TBI. It is detrimental directly after the trauma and seems to become a mediator of regeneration by mediating neuronal branching in the later course of the disease. These conflicting functions are most likely mediated by regulatory proteins (e.g. LFG or c-FLIP) that are expressed in the hippocampus [6, 15] and regulated after TBI [15]. Therefore, targeting these proteins might be an excellent therapeutic approach for TBI aiming to inhibit apoptotic neuronal death initially and to promote neuronal recovery later on.

## Acknowledgments

We wish to thank Marion Kubitz, Eva-Maria Stoerr, and Yesim Tevetoglu (Department of Neurosurgery, University of Regensburg) for their excellent technical assistance. Ralf Burger, Ana-Luisa Pina, and Ralf Rothoerl (Department of Neurosurgery, University of Regensburg) assisted with the animal experiments. This work was supported by a grant of the ReForm A program of the University of Regensburg

to CPB and DB.

## References

- 1 Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; **407**:789-795.
- 2 Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, *et al.* CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J* 2004; **23**:3175-3185.
- 3 Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, *et al.* Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 2003; **5**:118-125.
- 4 Bechmann I, Mor G, Nilsen J, *et al.* FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 1999; **27**:62-74.
- 5 Park C, Sakamaki K, Tachibana O, *et al.* Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **252**:623-628.
- 6 Beier CP, Wischhusen J, Gleichmann M, *et al.* FasL (CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of life-guard/neuronal membrane protein 35. *J Neurosci* 2005; **25**:6765-6774.
- 7 Cheema ZF, Wade SB, Sata M, *et al.* Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci* 1999; **19**:1754-1770.
- 8 Demjen D, Klussmann S, Kleber S, *et al.* Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 2004; **10**:389-395.
- 9 Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, *et al.* CD95 ligand (FasL/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 1999; **19**:3809-3817.
- 10 Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, *et al.* Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* 2006; **13**:31-40.
- 11 Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Neuron-specific enolase serum levels after controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 2001; **18**:569-573.
- 12 Hewicker M, Trautwein G. Sequential study of vasculitis in MRL mice. *Lab Anim* 1987; **21**:335-341.
- 13 Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 1981; **211**:67-77.
- 14 D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; **36**:60-90.
- 15 Hainsworth AH, Bermppohl D, Webb TE, *et al.* Expression of cellular FLICE inhibitory proteins (cFLIP) in normal and traumatic murine and human cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; **25**:1030-1040.

## **Einleitung:**

CD95 (APO- 1/Fas) und CD95L (APO- 1L/FasL/CD178) sind Zellrezeptoren der TNF/NGF- Familie. Ähnlich wie bei den anderen Rezeptoren dieser Familie führt die Aktivierung von CD95/Fas zur Bildung eines Komplexes aus FADD und Caspase-8 (death inducing complex) der schließlich durch die Aktivierung von Caspase 8 Apoptose induziert (Watanabe-Fukunage et al., 1992, Krammer, 2000). Im Tiermodell akuter neuronaler Schädigung, z.B. nach Schlaganfall oder Querschnitt, schneiden Mäuse mit defektem CD95/Fas besser ab und haben eine kleinere Läsion (Martin-Villalba et al., 1999, Qiu et al., 2002, Raoul et al., 2002, Demjen et al., 2004). Passend hierzu wurde eine Serie an Autopsien nach Schlaganfall untersucht: diese zeigte perifokale Apoptose in Kombination mit erhöhter CD95/Fas Immunreaktivität (Sairanen et al., 2006). Diese experimentiellen Daten suggerieren eine Beteiligung von CD95/Fas an der Entstehung der sekundären Hirnschädigung. Es wird immer wahrscheinlicher, dass in CD95/Fas exprimierenden Zellen, die resistent gegen den durch CD95/Fas induzierten Zelltod sind, Überleben, Proliferation und Migration ebenfalls durch diesen Rezeptor signalisiert werden kann (Kataoka et al., 2000, Lambert et al., 2003, Barnhart et al., 2004). Der nicht - apoptotische Signalweg von CD95/Fas beinhaltet die Phosphorylierung und Aktivierung des ERK 1/2 - p38 Signalweges und die Aktivierung von NFκB (Kataoka et al., 2000, Desbarats et al., 2003).

Die physiologische Rolle der CD95/Fas- Expression im Nervensystem ist immer noch unklar. Sowohl Rezeptor CD95/Fas als auch CD95L/FasL wurden im Gehirn entdeckt (Park et al., 1998, Bechmann et al., 1999, Beier et al., 2005) aber ihre Expressionsmuster verändern sich während der Entwicklung (Park et al., 1998, Cheema et al., 1999, Felderhoff-Mueser et al., 2000). Es ist unklar warum CD95/Fas im Hippocampus sehr stark, in anderen Teilen des Gehirns dagegen wenig exprimiert wird. Zwei wesentliche Veröffentlichungen zeigen eine mögliche Beteiligung von CD95/Fas am Wachstum und Teilung von Neuronen. Desbarats und Kollegen beschreiben eine verminderte funktionelle Regeneration nach peripherer Nervenschädigung bei Mäusen mit fehlendem CD95/Fas (lpr- Mäuse). Sie konnten zeigen dass das neuronale Auswachsen im peripheren Nervensystem CD95/Fas-abhängig über ERK 1/2 und p35 Aktivierung reguliert wird (Hikawa et al., 1997, Desbarats et al., 2003). Zuliani und Kollegen bewiesen, dass CD95/Fas die Sprossung von hippocampalen Neuronen *in vitro* kontrolliert, es ist aber unklar, ob CD95/Fas in der Lage ist die neuronale Regeneration im zentralen Nervensystem *in vivo* zu modulieren und ob CD95/Fas – CD95L/FasL an der Regeneration nach akuter neuronaler Schädigung beteiligt ist.

Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung des Einflusses von CD95/Fas auf die frühe und später funktionelle Regeneration von Motorik, Lernfähigkeit nach Schädelhirntrauma und die Klärung der Frage inwieweit der Rezeptor hierbei eine Rolle spielt.

## **Material und Methoden:**

### **Kontrolliertes kortikales Trauma (KKT)**

Das kontrollierte kortikale Trauma (KKT) wurde, wie von Woertgen et al. beschrieben (Smith et al., 1995, Woertgen et al., 2001), zusammen mit Dr. med. Christoph Beier durchgeführt. Die Mäuse wurden mit einem intraperitoneal injizierten Cocktail aus 100 mg/kg Ketamin, 6 mg/kg Xylazin und 1 mg/kg Acepromazin gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (UCSF- Anästhesie- Cocktail) anästhesiert. Nach ihrer Positionierung im Stereotaxierahmen wurde eine 5 x 5 mm große Kraniotomie über dem rechts parietotemporalen Kortex durchgeführt. Daraufhin folgte das eigentliche KKT mit einem pneumatische Zylinder, mit einem 2 mm- Kolben (Druck 25 kPa, Tiefe 1 mm, Einschlagdauer 100 ms). Das Knochenstück wurde nicht wieder implantiert, sondern nur die Haut vernäht. Die Mäuse erwachten innerhalb von 30 min und konnten wieder in ihre Käfige zurückgesetzt werden.

### **Verhaltenstests**

#### ***Beam Balance Test***

Mit Hilfe des *Beam Balance Test* ist es möglich die motorischen und koordinativen Fähigkeiten zu messen. Hierzu wurde ein 0,7 cm breiter, 10 cm langer Holzbalken auf einem 30 cm hohen Gestell (Abbildung 1) verwendet. Die Maus wurde auf den Holzbalken platziert und musste dort balancieren. Vor dem KKT wurde die Maus solange trainiert, bis sie sicher und reproduzierbar eine Minute mit allen vier Pfoten gleichzeitig auf dem Balken balancieren konnte.

Nach KKT wurde die Maus an den Testtagen je drei Mal auf den Balken platziert, je nach Ausmaß des neurologischen Ausfalls wurde die folgende Punktzahl vergeben:

- 0: Maus balanciert gleichmäßig, hat alle vier Pfoten auf dem Balken
- 1: Maus balanciert gleichmäßig, Pfoten greifen inkomplett auf den Balken
- 2: Maus balanciert, aber eine Extremität ist nicht mehr auf dem Balken
- 3: Maus balanciert, zwei Extremitäten sind nicht mehr auf dem Balken
- 4: Maus versucht zu balancieren, fällt aber runter (> 20 sec)
- 5: Maus fällt nach > 10 sec
- 6: kann sich nicht halten, fällt unter 10 sec



Abbildung 1: Foto *Beam Balance*



### ***Beam Walking Test***

Der *Beam Walking Test* untersucht Motorik, Koordination und Kraft. Für diesen Test benötigt man zwei Plattformen, die etwa hüfthoch sind und mit einem 60 cm langen Aluminiumstab (Durchmesser 0,6 cm) verbunden sind (Abbildung 2). Auf der Zielplattform steht ein Häuschen mit Trinkflasche und etwas Futter für die Mäuse. Auf der Startplattform ist eine kleine Lampe platziert die bei Mäusen einen starken Fluchtreflex auslöst.

An 3 Tagen vor dem KKT wurden die Mäuse in je 10 Versuchen trainiert, die Strecke über den Aluminiumstab ohne Sturz zu bewältigen. Nach Abschluss des Trainings konnten alle Mäuse sicher die Strecke laufen.

Nach dem KKT wurden die Mäuse pro Zeitpunkt vier Mal getestet, gemessen wurde die auf dem Stab zurückgelegte Strecke in 1 Minute. Wenn die Maus die Aufgabe schneller bewältigte, wurde die Strecke auf 1 Minute hochgerechnet ( $\text{Strecke (in 1 min)} = 60 \text{ cm} \cdot 60 \text{ sec} / \text{benötigte Zeit}$ ).



Abbildung 2: Foto *Beam Walking*

### ***Morris Water Maze***

Der *Morris Water Maze* Test ist ein etablierter Test für die Lern- und Merkfähigkeit. Verwendet wurde dazu eine schwarze Wanne (Durchmesser 1,05 m, Wassertiefe ca. 30 cm). Darin befindet sich eine Plattform aus Plexiglas, die 4 Seiten der Wanne wurden mit Markierungen versehen (Abbildung 3).

Die Wanne wurde mit 24°C warmen Wasser (  $\pm 1^\circ \text{C}$  ) befüllt, der Wasserüberstand auf der Plattform betrug 5 mm. Die Plattform stand für jede Maus immer an einer für sie definierten Stelle.

Jede Maus hatte maximal 1 min Zeit die Plattform zu finden, gelang ihr dies in der vorgegebenen Zeit nicht wurde sie auf die Plattform gesetzt, um die Position der Plattform zu lernen.

Die Mäuse hatten an jedem Testtag sechs Versuche, die für das Auffinden der Plattform benötigte Zeit wurde notiert, ein Fehlversuch mit 60 s gewertet.



Abbildung 3: Foto *Morris Watermaze*

## **Histologie:**

### **Histologische Aufarbeitung**

Die Mäuse wurden je nach Versuchsaufbau nach 24 h oder nach 22 d mittels einer Überdosis Analgetika euthanasiert. Die Gehirne der Mäuse wurden entnommen und auf Trockeneis schockgefroren. Die Aufarbeitung der gefrorenen Gehirne erfolgte am Kryostat, auf dem 7 µm dicke Schnitte erstellt wurden.

Die 24 h nach KKT entnommenen Gehirne wurden folgendermaßen aufgearbeitet: Sobald die Läsion makroskopisch sichtbar wurde, wurden 2 x 5 Schnitte aus diesem Bereich gewonnen, aus dem Zentrum der Läsion wurden 10 Schnitte zu 7 µm für die Färbungen aufgezogen und bis zu Weiterverarbeitung in -80°C tiefgefroren.

Zur Analyse des Läsionsgröße am 22. Tag nach dem KKT wurden systematisch, sobald die Läsion makroskopisch sichtbar wurde alle 10 µm dicke Schnitte gefertigt, von denen jeder 5 ausgewertet wurde.

### **Nissl- Färbung**

Die aufgetauten, mit 4 % Paraformaldehydpuffer (PFA) fixierten Schnitte wurden 40-45 min in 0,4% Kresylviolettlösung getaucht, anschließend wurden sie in einer aufsteigende Alkoholreihe entwässert, danach mit Wasser gespült und mit NeoMount® (Fa. Merck) eingedeckt.

### **TUNEL- Färbung**

Für die Färbung wurde der *ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit* (Fa. Chemicon) verwendet.

Die in 4% PFA fixierten Schnitte wurden zunächst in Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen, in Ethanol- Essigsäure fixiert, erneut in PBS gewaschen und mit Equilibration- Puffer versehen. Mit *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT)- Enzym (77 µl Reaction Puffer + 33 µl TdT) wurde 1 h bei 37°C inkubiert, im Anschluss erneute Inkubation für 10 min bei RT mit Stop- Wash- Puffer (10µl Puffer + 340µl aqua dest.). Nach dreimaligen Waschen wurde 4 h bei RT mit Blocklösung (3% Ziegen Serum in PBS) geblockt. Als letzter Schritt am ersten Tag wurde der 1. Antikörper (*Schaf-anti-Digitoxin-Fitc*) 1:250 verdünnt in Blocklösung aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst in Waschpuffer (12,11g Tris- Pulver + 1ml Triton X 100 auf 1000ml aqua dest.) gewaschen dann 30 min mit Blocklösung (10% Ziegen Serum) geblockt, als nächstes erfolgte das Auftragen des Primär-Antikörpers (*NeuN*, 1:400 verdünnt in Blocklösung) und Maus IgG (1:200 verdünnt), mit diesem wurde 2 h inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen (je 15min). Die Sekundärantikörper (*Ziege- anti- Maus- Rhodamin*, 1:200 verdünnt und *Ziege- anti- Schaf- FITC*, 1:500 verdünnt) wirkten ebenfalls 2 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurde 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1:10000 verdünnt aufgetragen, nach 5 min bei Raumtemperatur wurde gewaschen und mit Dabco (= Triethylendiamin) eingedeckt.

### **TUNEL- DAB (3,3'-Diaminobenzidin):**

Für diese Färbung wurde der *ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* (Fa. Chemicon) verwendet

Die Schnitte wurden zunächst 10 min bei Raumtemperatur in 1% PFA fixiert, dann zwei mal 5 min in PBS gewaschen; fixiert wurde 5 min bei -20°C in Ethanol- Essigsäure im Verhältnis 2:1. Anschließend wurde erneut zweimal 5 min in PBS gewaschen und 5 min bei Raumtemperatur in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS inkubiert. Nach nochmaligem fünfminütigem Waschen in PBS wurde der Equilibration- Puffer aufgetragen. Nach 10 s bei Raumtemperatur wurde mit TdT- Enzym (77 µl Reaction Buffer + 33 µl TdT) 1 h bei 37°C inkubiert. Danach 10 min bei RT mit Stop- Wash- Puffer (10 µl Buffer + 340 µl aqua dest.) behandelt. Nach dreimaligen waschen (je 1 min in PBS) wurde 30 min bei Raumtemperatur mit anti- digoxigenin- peroxidase- conjugate inkubiert. Im Anschluss wurde erneut vier mal 2 min in PBS gewaschen und dann Peroxidase Substrat (147 µl DAB Dilution und 3 µl DAB Substrate) aufgetragen. Nach 8 min wurde die Reaktion mit dreimaligem Waschen (je 1 min) in aqua dest. gestoppt. Die Schnitte wurden nun 5 min bei Raumtemperatur in aqua dest. belassen, anschließend mit Nissl gegengefärbt und mit NeoMount® eingedeckt.

### **Auswertung Histologie:**

#### Nissl:

Die maximale Ausdehnung der Läsion in der koronaren Ebene wurde mithilfe der Nissl- Färbung ermittelt. Durch die oben beschriebene Färbung wird das endoplasmatische Reticulum der Neurone violett angefärbt. Man kann in dieser Färbung sehr gut zellreiche Strukturen erkennen, z.B. den Hippocampus aber auch gut Läsionen ausmessen.

Pro Vorversuch- Tier wurde ein Schnitt gefärbt. Unter dem Mikroskop wurde der Schnitt mittels der Software Analysis (Olympus Hamburg) fotografiert, die geschädigte Fläche ausgemessen und zum Zeitpunkt nach KKT in Relation gesetzt.

Im Hauptversuch wurden je fünf Schnitte pro Maus aus dem Zentrum der Läsion nach oben genanntem Protokoll nach Nissl gefärbt. Anschließend wurde ebenfalls die Läsionsgröße ausgemessen und die Werte nach Ipr- und Kontrolltieren aufgeschlüsselt.

#### TUNEL:

Für die Bestimmung der Apoptoserate wurde eine TUNEL- Färbung durchgeführt. Je drei Schnitte pro Tier, zwei nach Protokoll und einer ohne TdT als Negativkontrolle wurden nach oben beschriebenem Protokoll gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde der Gyrus dentatus des Hippocampus (Hippocampusknies) aufgesucht, und mit den Filtereinsätzen fotografiert. Die Absolutzahl der tunelpositiven Zellen wurde dem Zeitpunkt nach KKI gegenübergestellt.

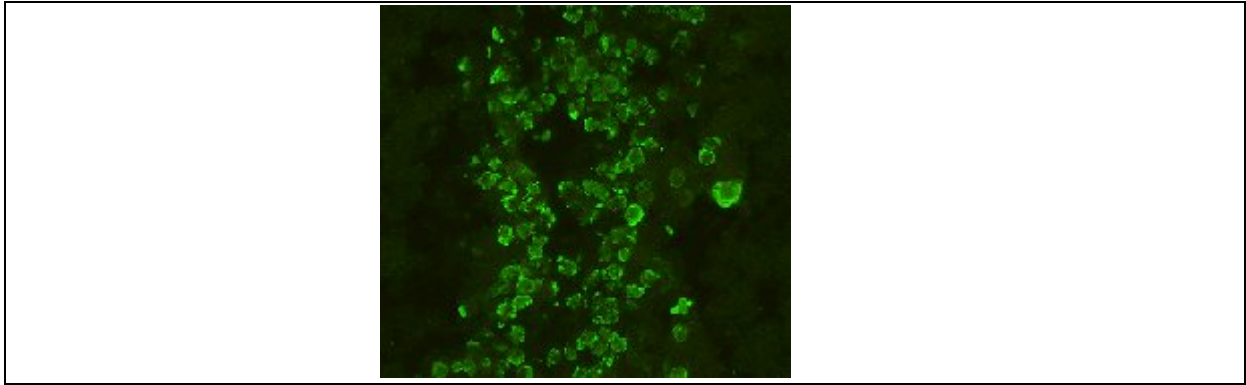


Abbildung 4: TUNEL- Färbung des Hippocampus 24 h nach Trauma: Die apoptotischen Zellen leuchten im Fluoreszenz- Mikroskop in grün.

#### TUNEL- DAB:

Die tunelpositiven Zellen sind braun angefärbt, die anderen Zellen (v.a. im Hippocampus) durch Nissl violett. Je Maus wurden zwei Objektträger nach oben genanntem Protokoll gefärbt (d.h. jeder vierte Schnitt insgesamt 8 Schnitte pro Tier) und wie folgt ausgewertet: die Fläche der betroffenen Hippocampusregion wurde ausgemessen und die darin befindlichen tunelpositiven Zellen gezählt. In eine Tabelle wurden dann die positiven Zellen pro  $\mu\text{m}^2$  betroffener Hippocampus eingetragen und später dann die lpr und Kontrolltiere einander gegenübergestellt.

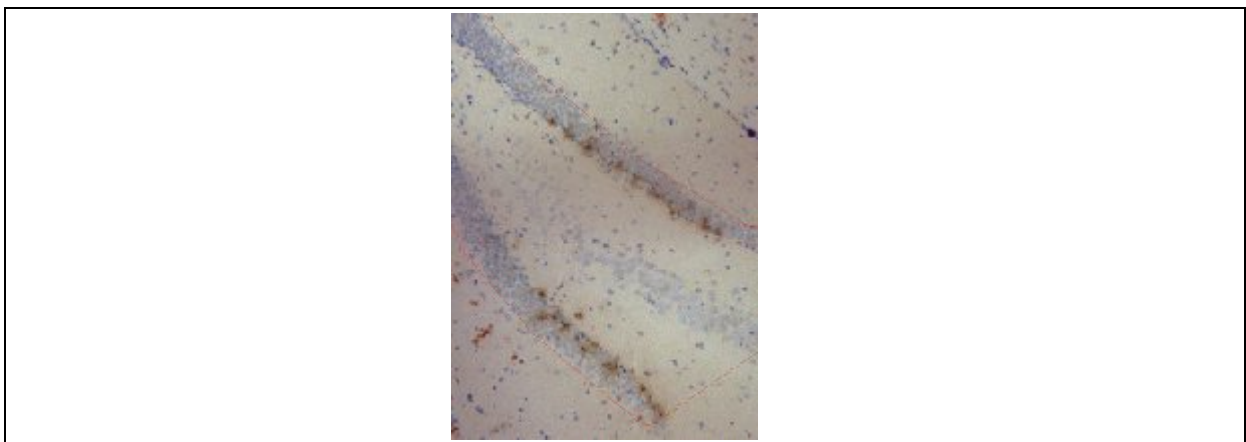


Abbildung 5: TUNEL- DAB: Zellkerne durch Nissl- Gegenfärbung violett, apoptotische Zellen sind braun dargestellt.

## Ergebnisse:

### **Etablierung des KKT für Mäuse**

Für das Tiermodell des kontrollierten kortikalen Traumas musste die in der Abteilung für Neurochirurgie schon für Ratten etablierte Apparatur für die Verhältnisse an der Maus angepasst werden. Hierzu wurde ein Vorversuch vorgeschaltet, mit dem das KKT durch den neuen Versuchsaufbau charakterisiert wurde.

### Allgemeinzustand der Tiere

Die Gewichtsveränderung ist ein sensibler Marker für den Allgemeinzustand der Versuchstiere. Deshalb wurde nach der Applikation des KKT täglich das Gewicht der Tiere gemessen. Abbildung 6 zeigt, dass es nach dem Trauma zu einer kurzfristigen Gewichtsabnahme kam, von der sich die Tiere aber rasch wieder erholten. Keines der Versuchstiere hatte einen Gewichtsverlust von mehr als 20%, d.h. die Tiere hatten zwar neurologische Ausfälle (s.u.), die Verschlechterung des Allgemeinzustandes war jedoch tolerabel.

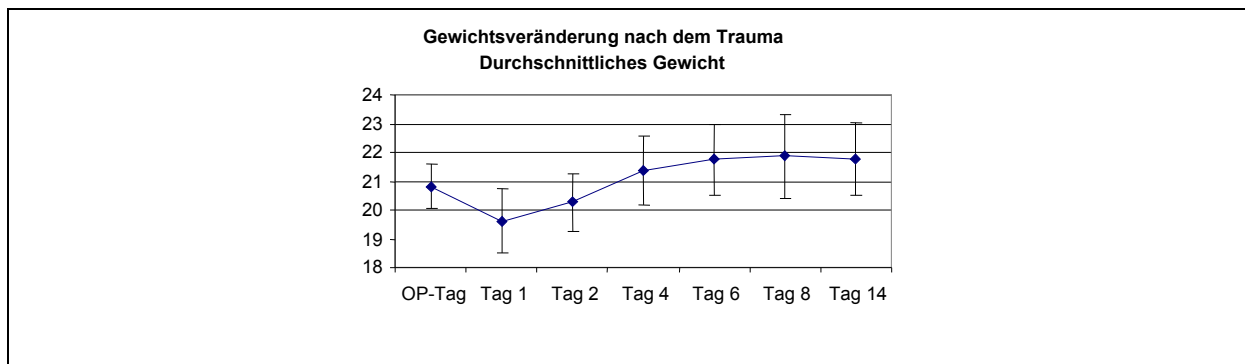


Abbildung 6: Gewichtsveränderung nach dem Trauma.

### Läsionsgröße

Um das Ausmaß der Schädigung des Hirns durch KKT zu quantifizieren wurde in den Nissl gefärbten Schnitten die Läsionsgröße an verschiedenen Zeitpunkten nach dem KKT bestimmt. In Abbildung 7 ist erkennbar dass die Läsion am Tag 2 maximal ist und dann kontinuierlich abnimmt.

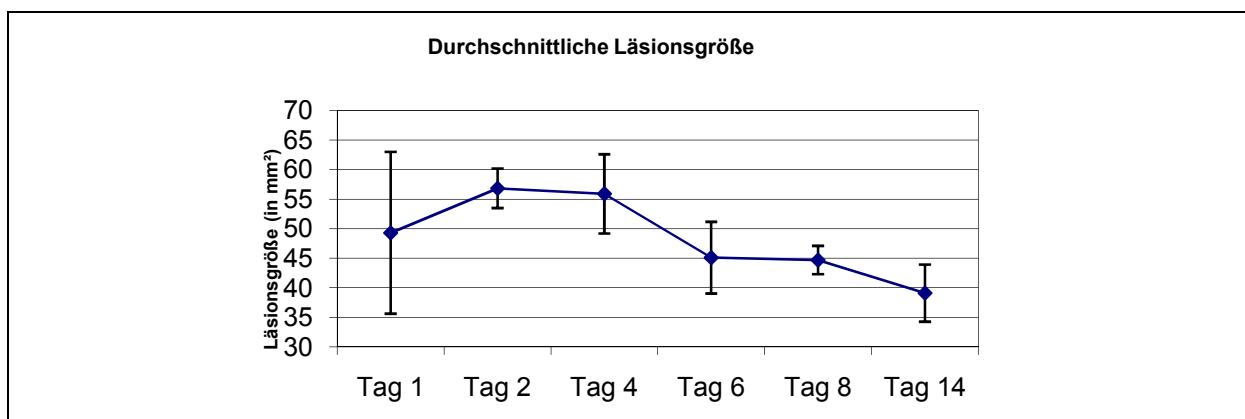


Abbildung 7: Durchschnittliche Läsionsgröße in Relation zum Tag nach Trauma.

### Schädigung von Motorik sowie Lernfähigkeit nach KKT

Durch das kontrollierte kortikale Trauma wird ein schweres Schädelhirntrauma verursacht. Die Mäuse sind dadurch zunächst in ihren motorischen und kognitiven Fähigkeiten eingeschränkt. Im Verlauf regenerieren sich die Tiere aber relativ schnell wieder. Gut erkennbar ist das an den Ergebnissen der Mäuse in den Verhaltenstests. In Abbildung 8 sind die Leistungen der Tiere Im *Beam Walking Test* aufgezeichnet. Mit Tag 0 wurde der Zustand vor dem KKT jedoch nach dem Training bezeichnet, der Leistungseinbruch nach KKT bessert sich binnen einer Woche und die Mäuse erreichen sogar wieder die Leistungsfähigkeit von vor Beginn der Experimente.

Abbildung 9 zeigt den *Beam Balance Test*, die Mäuse wurden präoperativ so trainiert, dass sie sicher auf dem Balken sitzen können, nach Applikation des KKT kommt es zu einer deutlichen Verschlechterung, sie fallen vom Balken oder können sich bestenfalls mit einer Pfote halten. Im Verlauf kommt es zu einer deutlichen Besserung, allerdings wird, anders als im *Beam Walking Test* der Ausgangswert nicht mehr erreicht.

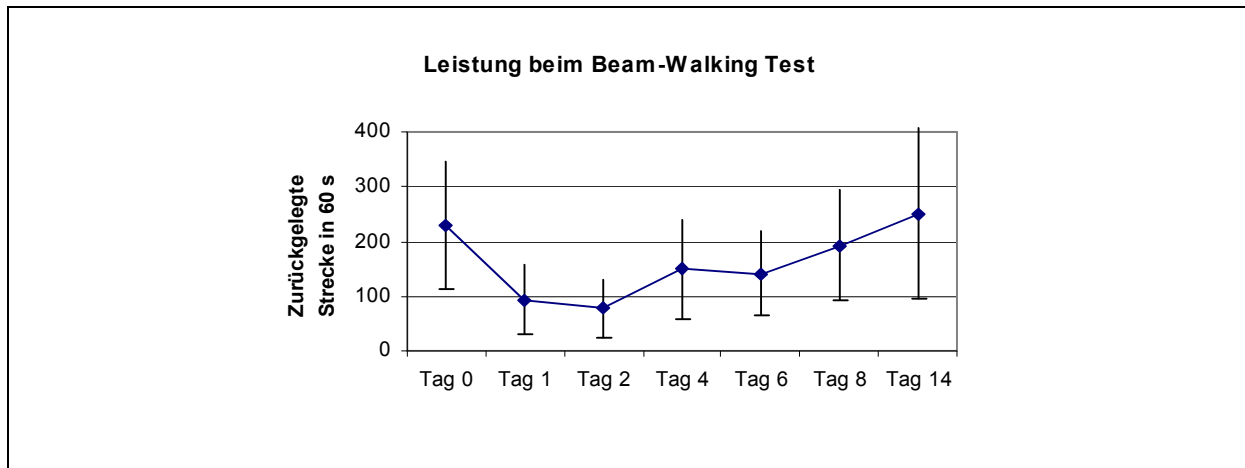


Abbildung 8: *Beam Walking Test*: aufgetragen die durchschnittlich erreichte Strecke in 60s.

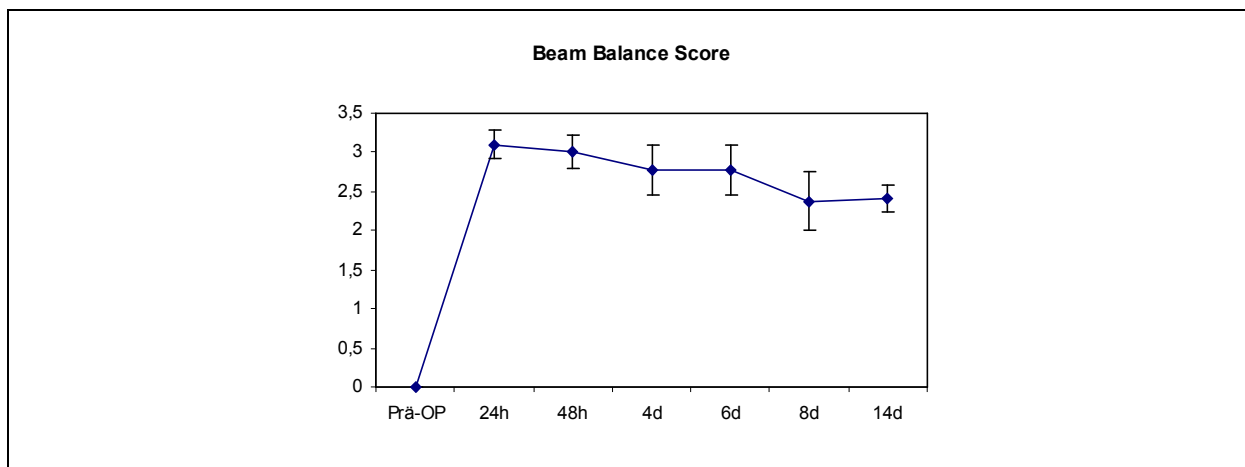


Abbildung 9: *Beam Balance Score*: Durchschnittliche Werte der einzelnen Gruppen.

Abbildungen 10 und 11 zeigen die Ergebnisse der Tiere im *Morris Water Maze*. Zum einen sind die Anzahl der erfolgreichen Versuche pro Gruppe dargestellt, d.h. wie oft von den maximal sechs möglichen Versuchen wurde die Plattform im Durchschnitt pro Gruppe gefunden (Abbildung 10). Und zum anderen die durchschnittliche Zeit bis zum Finden der Plattform in Abhängigkeit vom Tag nach KKT (Abbildung 11). Die Sham-Tiere dienen als Vergleichsgruppe, sie wurden ebenfalls operiert, hatten aber kein Trauma erlitten. Man sieht dass sie in beiden Diagrammen deutlich besser abschneiden. Die Tiere die den Test unmittelbar oder in kurzem Abstand zum Trauma durchlaufen haben sind deutlich schlechter. Man erkennt aber auch dass die Tiere am Tag 8 bzw. Tag 14 fast die Werte der „gesunden“ Tiere erreichen, d.h. die Lernfähigkeit hat sich fast vollständig erholt.

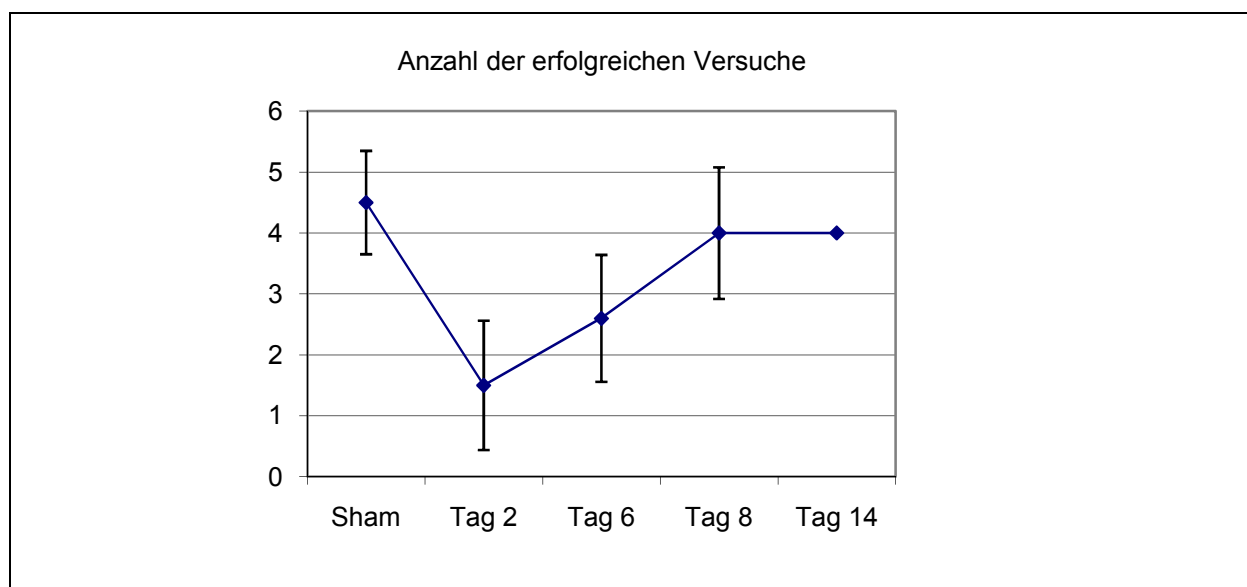


Abbildung 10: *Watermaze*: Anzahl der erfolgreichen Versuche in Abhängigkeit vom Tag nach KKT.

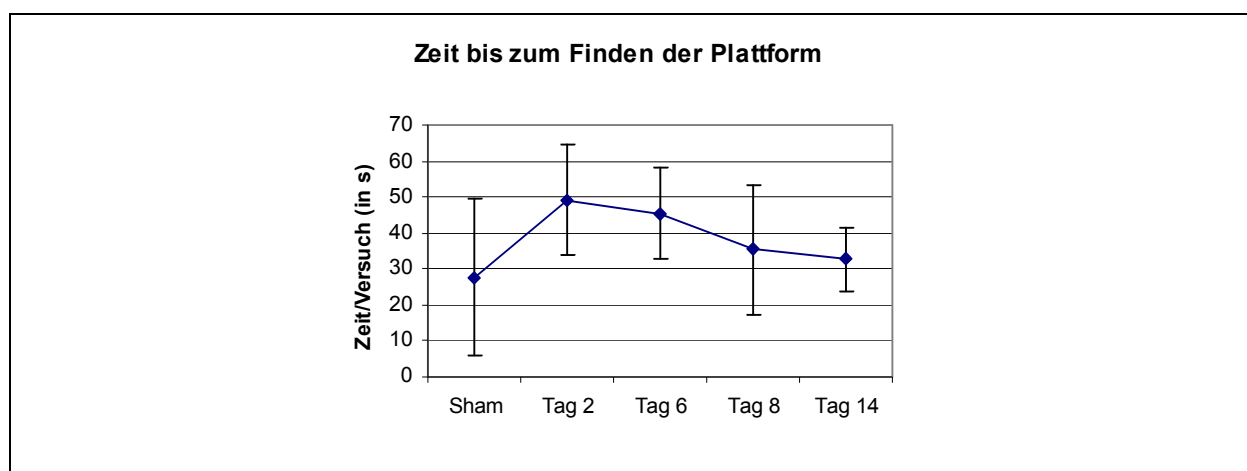


Abbildung 11: *Watermaze*: Durchschnittliche Zeit bis zum Finden der Plattform in Abhängigkeit vom Tag nach KKT.

### Neuronale Apoptose nach KKT:

Beim KKT kommt es ebenso wie beim Schädelhirntrauma des Menschen zu periläsionaler neuronaler Apoptose, die als das wichtigste Korrelat des sekundären Schadens gilt. Im Vorversuch wurde deshalb die Dynamik der Apoptose nach kontrolliertem kortikalem Trauma untersucht. Der Gyrus dentatus des Hippocampus wurde als gut abgrenzbare Struktur ausgewählt und in den einzelnen Gruppen auf TUNEL- positive Zellen gefärbt. Die Absolutzahl der TUNEL- positiven Zellen wurde in Relation zum Zeitpunkt nach KKT gestellt. Hier wurde deutlich, dass die maximale Apoptoserate bei 24 h liegt (Abbildungen 12 und 13).

Auf Grundlage dieser Daten wurden bei den weiteren Versuchen zur Bestimmung der Apoptoserate Schnitte von Mäusen verwendet, die 24 h nach Trauma getötet wurden.

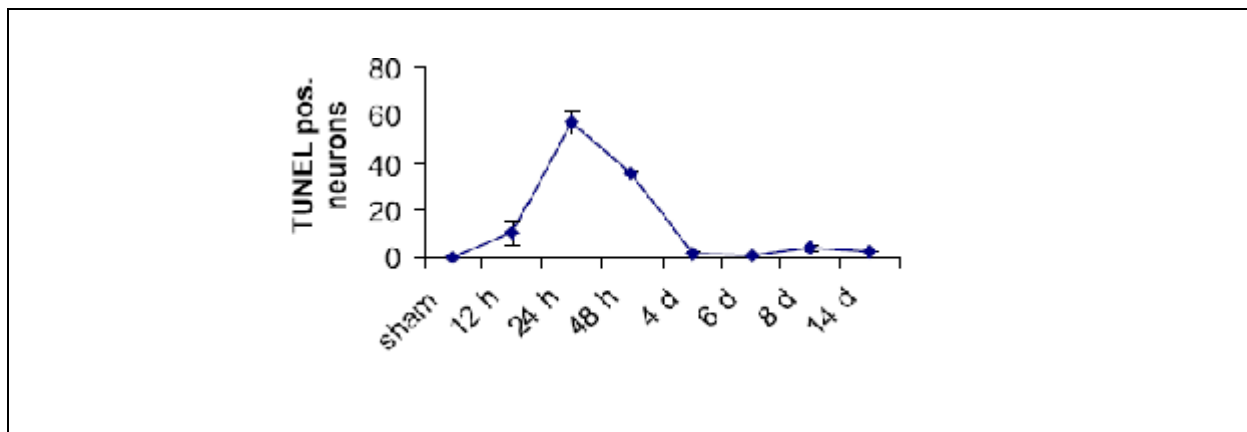


Abbildung 12: TUNEL- positive Zellen in Relation um Zeitpunkt nach KKT.

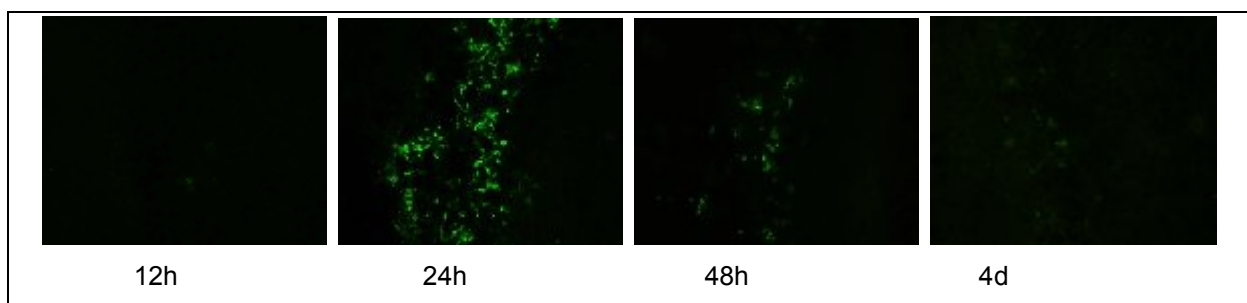


Abbildung 13: Repräsentative Fotos von Bereichen des Hippocampus zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach KKT, TUNEL- positive Zellen leuchten in grün.



## Untersuchung der Bedeutung von CD95/Fas für die Regeneration nach KKT

### Neuronale Apoptose in lpr- und Kontrolltieren:

Für diese Versuche wurden 5 Kontroll- und 4 lpr- Mäuse mit gleichem genetischen Hintergrund verwendet, eine Anonymisierung erfolgte durch die Vergabe eines Zahlencodes. Die Tiere wurden 24 h nach KKT euthanasiert und die Gehirne anschließend histologisch aufgearbeitet. Je Tier wurden 8 Schnitte aus dem Läsionsbereich mittels der TUNEL- Färbung auf apoptotische Zellen untersucht, die TUNEL positiven Zellen pro Fläche betroffener Hippocampus bestimmt und im Anschluss mittels des Zahlencodes nach Kontroll- oder lpr- Maus aufgeschlüsselt.

Es zeigte sich dass die Schnitte der Gruppe der lpr- Mäuse signifikant weniger tunelpositive Zellen im Bereich des Hippocampus aufwiesen als die Schnitte von den Kontrolltieren (Abbildungen 14 und 15). Somit ist die neuronale Apoptose in lpr- Mäusen geringer als in den Wildtyptieren, die Neuronen im Hippocampus sind also für die direkte neuronale Schädigung nach dem Trauma geschützt.

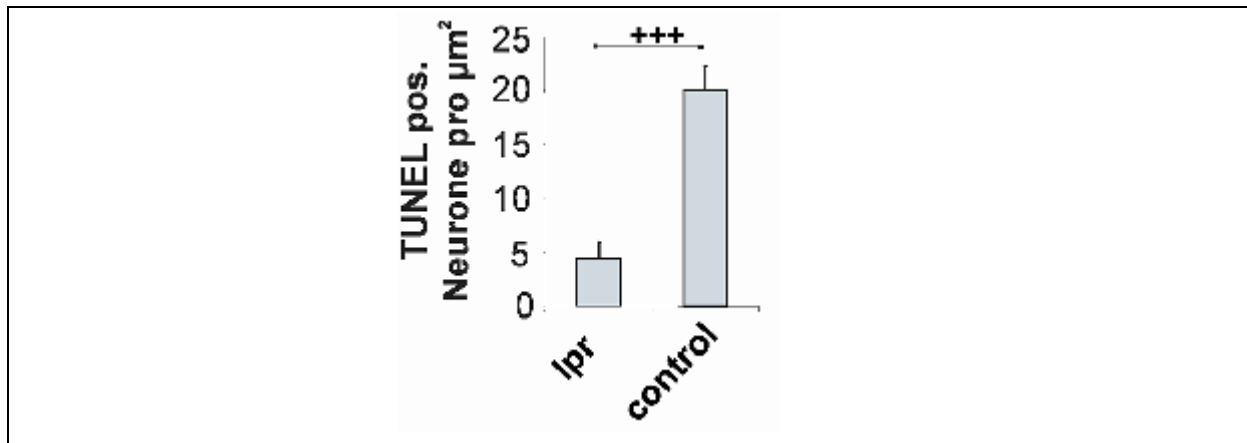


Abbildung 14: TUNEL- positive Neurone pro  $\mu\text{m}^2$  betroffener Hippocampus 24 h nach KKT

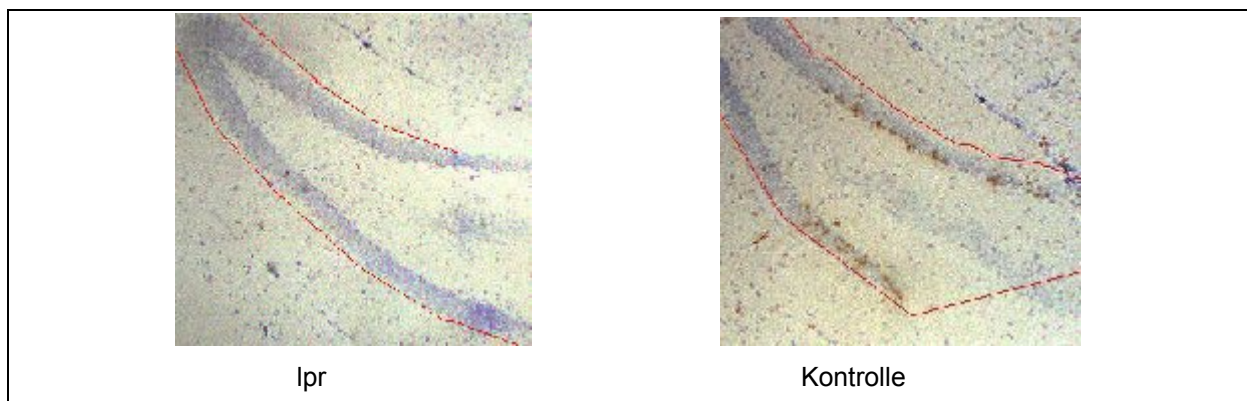


Abbildung 15: Repräsentative Fotos von Hippocampusabschnitten, Neuronen sind violett (Nissl-Gegenfärbung) und die TUNEL- positiven Zellen sind braun gefärbt (DAB- Färbung)

### Neurologische Regeneration nach KKT:

Diesen Versuch durchliefen je 8 lpr- und Kontrolltiere, die ebenfalls mittels eines Zahlencodes anonymisiert wurden. Die Tiere wurden an den drei präoperativen Tagen und bis Tag 22 postoperativ getestet. Am Tag 22 nach Trauma wurden sie getötet und die Größe der Läsion mit Hilfe der Nissl-Färbung bestimmt und die Ergebnisse nach Kontroll- oder lpr- Gruppe aufgeschlüsselt. Passend zu der geringeren neuronalen Apoptose nach KKT, zeigten lpr-Mäuse signifikant kleinere Läsionen im Vergleich zu den Kontrolltieren.

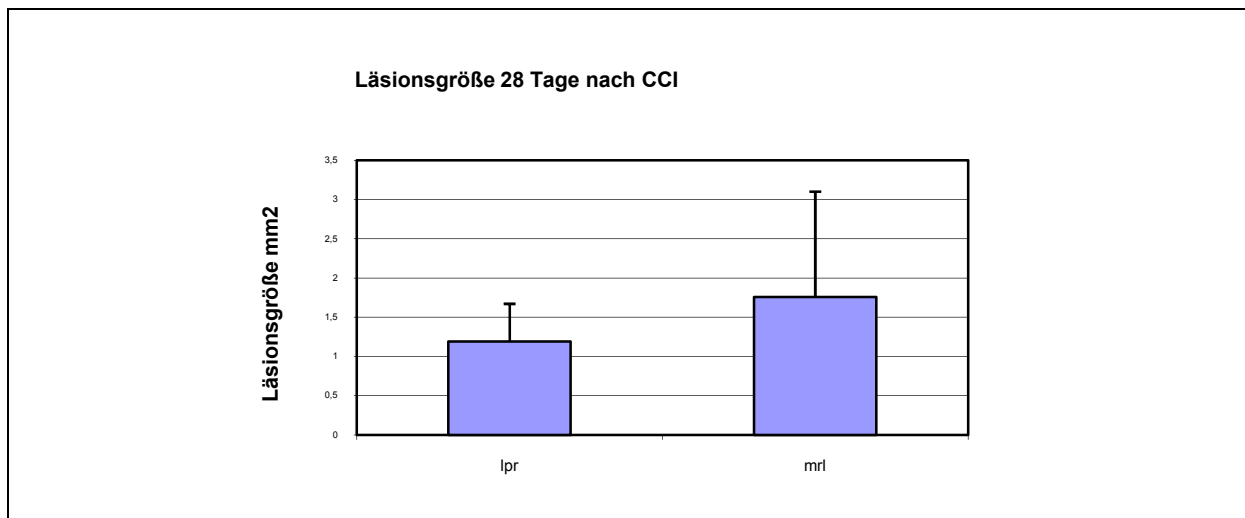


Abbildung 16: Durchschnittliche Läsionsgröße in der lpr- und Kontroll- Gruppe.

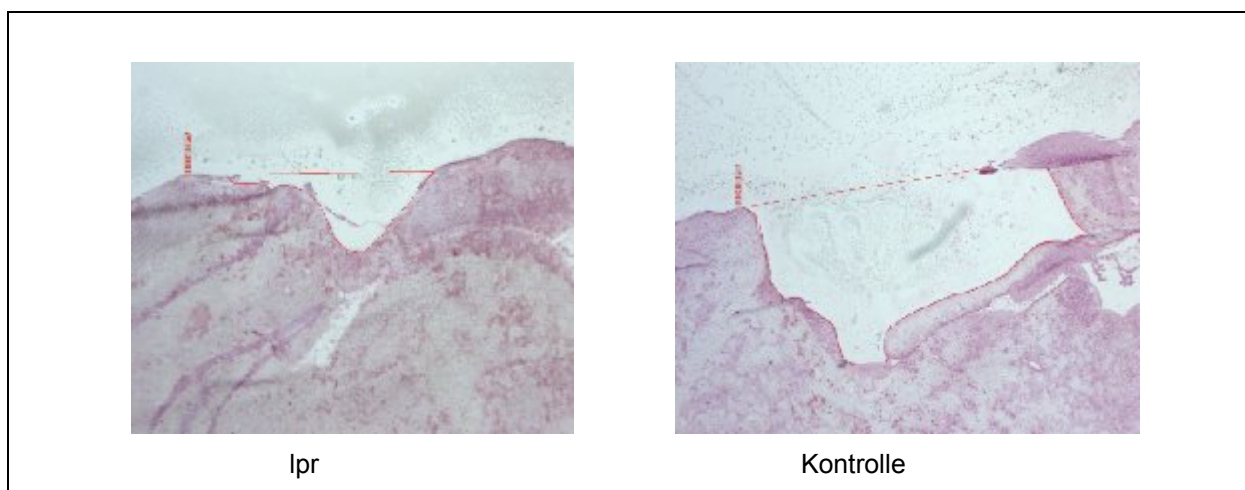


Abbildung 17: Fotos zwei repräsentativer Schnitte, ausgemessen ist die Größe der Läsion.

### **lpr- Mäuse haben geringere neurologische Defizite 48 und 72 h nach KKT:**

Um Aussagen über die neurologischen Fähigkeiten machen zu können verwendeten wir erneut die bereits in den Vorversuchen bewährten Verhaltenstests. In allen Tests schnitten lpr- Mäuse 72 h nach Trauma, d.h. 48 h nach dem Apoptosepeak, besser ab.

In allen Tests wurden dieselben 16 Mäuse untersucht (8 lpr und 8 Kontrolltiere). Alle Tiere erlernten wie in den Vorversuchen die Verhaltenstests drei Tage vor KKT. In Abbildung 18 ist die durchschnittliche Zeit bis zum Finden der Plattform in Abhängigkeit vom Tag nach Trauma aufgetragen. Man sieht dass vor dem Trauma die Kontrolltiere leicht besser abschneiden. Dies ändert sich initial nach dem Trauma, 48 h und 72 h nach KKT zeigen die lpr- Mäuse signifikant bessere Leistungen, d.h. sie sind durch das Trauma weniger beeinträchtigt. Dasselbe zeigt sich auch im *Beam Walking Test* (Abbildung 19) und im *Beam Balance Test* (Abbildung 20).

### **Geringere Regeneration von Lernen und Gedächtnis**

Über das Mitwirken von CD95/ Fas bei der neuronalen Regeneration im peripheren Nervensystem wurde bereits berichtet (Desbarats et al., 2003). Wir nahmen an, dass CD95/ Fas auch an der neurologischen Regeneration beteiligt sein könnte und untersuchten deshalb die Regeneration der neurologischen Defizite nach KKT. Dazu wurden die Mäuse, die direkt nach KKT getestet wurden (Abbildungen 18-20) erneut an den Tagen 6, 8, 10 und 21 nach KKT getestet. Es zeigte sich eine geringere Regeneration der Lern- und Gedächtnisfunktion der lpr- Mäuse. Diese schnitten direkt nach KKT zwar besser ab als die Wildtypgruppe, im Verlauf erholten sich die Kontrolltiere im Vergleich zu den lpr- Mäusen jedoch schlechter, d.h. sie hatten trotz der nach dem Trauma stärkeren neurologische Defizite bereits nach 10 Tagen signifikant bessere Werte im Morris Water Maze als die lpr Tiere. Der Unterschied wurde im weiteren Verlauf der Regenerationsphase noch deutlicher. (Abbildung 18)

Die langsamere Regeneration der Lern- und Gedächtnisfunktion steht im Gegensatz zu den Ergebnissen im *Beam Walking* und im *Beam Balance*. lpr- bleiben hier auch im Verlauf besser als die Kontrolltiere (Abbildungen 19 und 20).

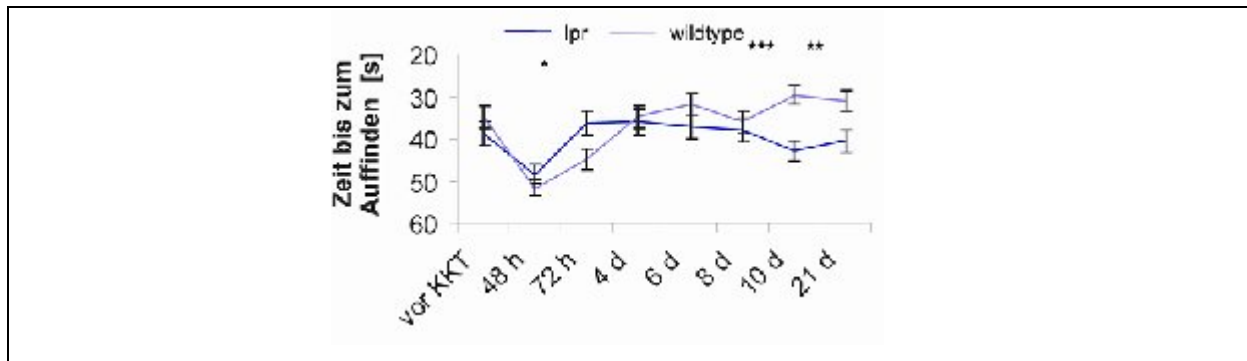


Abbildung 18: *Morris Watermaze*: Dargestellt ist die Durchschnittszeit die benötigt wurde bis zum Erreichen der Plattform. Pro Maus und Zeitpunkt wurden 6 Versuche durchgeführt.

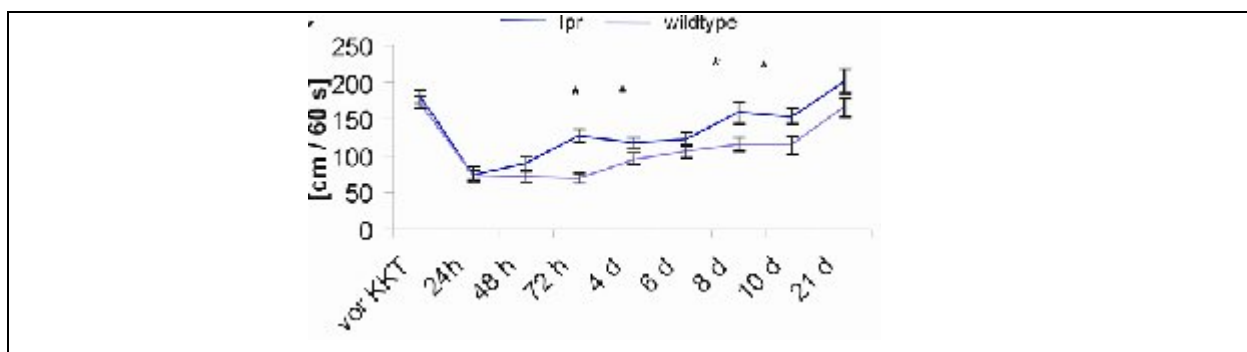


Abbildung 19: *Beam Walking*: Die Strecke die die Mäuse durchschnittlich in 60 s erreichten. Der Test wurde pro Maus und Zeitpunkt viermal wiederholt.

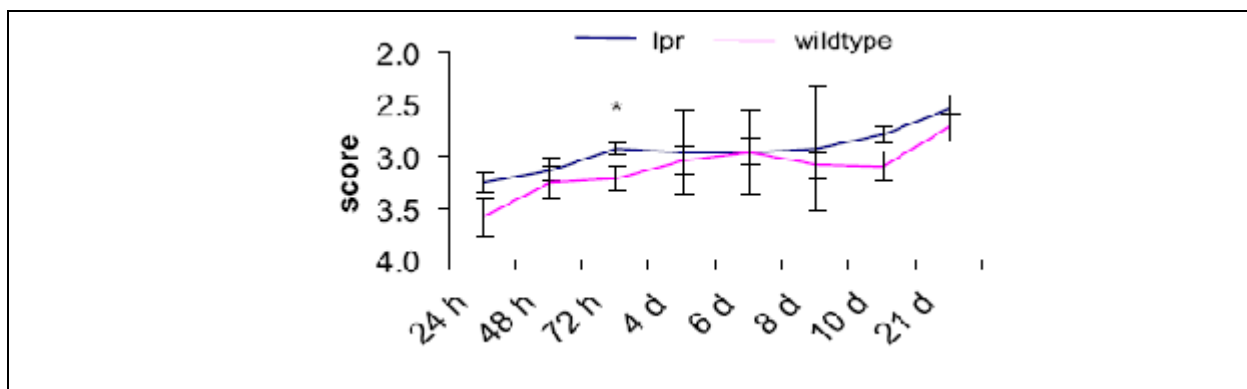


Abbildung 20: *Beam Balance*: Der durchschnittlich erreichte Score. Es wurden vier Versuche pro Maus und Zeitpunkt durchgeführt.

## **Diskussion:**

Obwohl die Expression von CD95/Fas im ZNS bereits gut erforscht ist, bleibt seine physiologische Rolle im Ungewissen. Das Expressionsmuster ändert sich während der Entwicklung (Cheema et al., 1999), im Gehirn eines Erwachsenen wird es am stärksten in Hippocampusneuronen exprimiert (Park et al., 1998). Ana Martin-Villalba und Mitarbeiter haben kürzlich bewiesen dass hippocampale Dendriten CD95/ Fas- vermittelt *in vitro* aussprossen. In Anlehnung an ihre Veröffentlichung konnten wir zunächst zeigen dass CD95/ Fas einen bedeutender Mediator der funktionellen Regeneration im ZNS nach Schädelhirntrauma darstellt (Zuliani et al., 2006). Obwohl der CD95/ Fas- Mangel anfänglich die neuronale Apoptose im Hippocampus verhinderte, wurde die Wiederherstellung der Gedächtnisfunktion bedeutsam verschlechtert (Abbildung 18). Die beschriebenen Daten unterstützen die Annahme dass CD95/ Fas an der Gedächtnisfunktion beteiligt ist und bieten damit eine Erklärung für die vermehrte Expression von CD95/ Fas im Hippocampus. 1993 berichtete Sakic über die Verschlechterung von Lernen und Gedächtnis, er vermutete damals aber einen durch den systemischen Lupus erythematodes bedingten Effekt (Sakic et al., 1993). Verwendet wurden in gezeigten Experimenten jedoch junge Mäuse ohne klinische oder histologische Zeichen einer beginnenden Autoimmunerkrankung, die, wie berichtet, im Alter von 12 Wochen beginnt (Hess et al., 1993). Außerdem zeigten wir eine selektive Schwäche des räumlichen Gedächtnisses aber nicht der motorischen Funktion (Abbildung 18, 19, 20). Eine für den Lupus typische systemische Vaskulitis als Ursache für die Verschlechterung ist deshalb unwahrscheinlich.

Der sekundäre Schaden nach Schädelhirntrauma trägt bedeutsam zum Neuronenverlust und der allgemeinen Morbidität der betroffenen Patienten bei. Obwohl die Aktivierung der Caspasen und die letztlich daraus resultierende neuronale Apoptose bei der sekundären Schädigung nach Schädelhirntrauma bereits gut erforscht sind, ist der Mechanismus der die apoptotische Kaskade initiiert weitgehend unbekannt. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Inaktivierung von CD95/ Fas im Tiermodell protektiv beim schweren Schädelhirntrauma wirkt. (Abbildung 14 und Abbildung 16, 17). Dies passt zu Daten anderer Tiermodelle (z.B. Schlaganfall) in denen verschiedenen Gruppen zeigten, dass der CD95/ Fas- Mangel im Tiermodell vor akutem Hirnschaden schützt. Bis heute ist jedoch der Mechanismus, durch den CD95/Fas zu neuronalem Schaden beitragen könnte, umstritten (Wanner et al., 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD95/Fas- Mangel die Zahl der apoptotischen, tunelpositiven Neurone im Hippocampus reduziert. Verringerte neuronale Apoptose nach dem Trauma resultiert in geringeren neurologischen Defiziten in Lpr- Mäusen direkt nach KKI. Dies deutet an, dass CD95/ Fas die apoptotische Kaskade in den Neuronen direkt initiiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit suggerieren dass CD95/Fas zwei verschiedene Funktionen beim Schädelhirntrauma aufweist. Er induziert direkt die neuronale Apoptose nach dem Trauma und vermittelt die funktionelle Regeneration von CD95/Fas- exprimierenden Neuronen, z.B. im Hippocampus. Diese doppelte Rolle macht CD95/Fas zu einem potentiellen therapeutischen Ziel. Regulatorproteine wie z.B. c-Flip sind bekannt dafür dass sie CD95/Fas- induzierte Apoptose hemmen und die Aktivierung nicht-apoptotischer Signalwege fördern (Kataoka et al., 2000). Sie könnten damit

einen exzellenten Therapieansatz für den akuten Hirnschaden darstellen, der anfangs den apoptotischen Zelltod hemmt und später die neuronale Regeneration fördert.

## LITERATUR

- Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, et al. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *Embo J*. 2004 Aug 4; 23(15):3175-3185.
- Bechmann I, Mor G, Nilsen J, et al. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*. 1999 27(1):62-74.
- Beier CP, Wischhusen J, Gleichmann M, et al. FasL (CD95L/APO-1L) resistance of neurons mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B-dependent expression of lifeguard/neuronal membrane protein 35. *J Neurosci*. 2005 Jul 20; 25(29):6765-6774.
- Cheema ZF, Wade SB, Sata M, et al. Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci*. 1999 19(5):1754-1770.
- Demjen D, Klussmann S, Kleber S, et al. Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med*. 2004 Mar 7;
- Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, et al. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol*. 2003 Feb; 5(2):118-125.
- D'Hooge R, De Deyn PP Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Aug; 36(1):60-90.
- Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, et al. Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol*. 2000 10(1):17-29.
- Hess DC, Taormina M, Thompson J, et al. Cognitive and neurologic deficits in the MRL/lpr mouse: a clinicopathologic study. *J Rheumatol*. 1993 Apr; 20(4):610-617.
- Hikawa N, Kiuchi Y, Maruyama T, et al. Delayed neurite regeneration and its improvement by nerve growth factor (NGF) in dorsal root ganglia from MRL-lpr/lpr mice in vitro. *J Neurol Sci*. 1997 Jul; 149(1):13-17.
- Kataoka T, Budd RC, Holler N, et al. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*. 2000 10(11):640-648.
- Krammer PH CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000 407(6805):789-795.
- Lambert C, Landau AM, Desbarats J Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis*. 2003 Dec; 8(6):551-562.
- Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, et al. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci*. 1999 19(10):3809-3817.
- Park C, Sakamaki K, Tachibana O, et al. Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 252(3):623-628.
- Qiu J, Whalen MJ, Lowenstein P, et al. Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans. *J Neurosci*. 2002 22(9):3504-3511.
- Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, et al. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. Potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*. 2002 Sep 12; 35(6):1067-1083.
- Sairanen T, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, et al. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke--a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain*. 2006 Jan; 129(Pt 1):189-199.
- Sakic B, Szechtman H, Denburg S, et al. Spatial learning during the course of autoimmune disease in MRL mice. *Behav Brain Res*. 1993 Mar 31; 54(1):57-66.
- Smith DH, Soares HD, Pierce JS, et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma*. 1995 Apr; 12(2):169-178.
- Stanley JL, Lincoln RJ, Brown TA, et al. The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *J Psychopharmacol*. 2005 May; 19(3):221-227.
- Wanner GA, Mica L, Wanner-Schmid E, et al. Inhibition of caspase activity prevents CD95-mediated hepatic microvascular perfusion failure and restores Kupffer cell clearance capacity. *Faseb J*. 1999 Jul; 13(10):1239-1248.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, et al. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992 356(6367):314-317.
- Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A Neuron-specific enolase serum levels after controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2001 May; 18(5):569-573.
- Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, et al. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ*. 2006 Jan; 13(1):31-40.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name	Martina Kölbl
Anschrift	Gassenweg 51 94089 Neureichenau
Telefon	08583 918591
Geburtsdatum	23.12.1979
Geburtsort	Freyung

## **Eltern/Familie**

Vater	Gerhard Kölbl Beruf: Pflegedienstleiter
Mutter	Christine Kölbl Beruf: Hausfrau
Geschwister	Yvonne, 27 Jahre Barbara, 23 Jahre Andreas, 20 Jahre

## **Ausbildung**

09/1986 – 07/1999	Schul Ausbildung
10/1999 – 09/2000	Berufsfachschule für Physiotherapie, Freyung
10/2000 – 11/2007	Studium Humanmedizin Uni Regensburg
Seit 01/2008	Assistenzärztin Abteilung Anästhesie Klinikum Passau



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Dr. Christoph Beier bedanken, der mich während der gesamten Arbeit in außergewöhnlicher Weise unterstützt hat und auf dessen Hilfe und Rat ich auch in schwierigen Abschnitten immer zählen konnte.

Besonders darf ich mich auch bei Yesim Tevetoglu, Eva-Maria Störr, Marion Kubitza und Dr. Dagmar Beier bedanken, die mich an das wissenschaftliche Arbeiten im Labor herangeführt und mir bei kleineren und größeren Problemen immer unter die Arme gegriffen haben.

Den größten Dank schulde ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und die Promotion überhaupt erst ermöglicht haben.